

EE 03 /00005



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

The Estonian Patent Office

REC'D 09 OCT 2003

WIPO

PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

TÕEND Certificate

Taotluse nr
Application No **200200531**

Käesolevaga tõendatakse, et lisatud ärakiri on Patendiametile esitatud taotluse
algdokumentide tõene ärakiri.

This is to certify that the copy annexed hereto is a true copy from the documents of
application as originally filed with the Estonian Patent Office.

Tallinn 22. 09. 2003

Osakonnajuhataja
Head of Department



Patendiamet tõendab, et
The Estonian Patent Office certifies that

OÜ InBio

esitas patenditaotluse nr
filed a patent application No

P200200531

leiutisele
entitled

Terapeutiliste rakkusisenevate antikehade saamine ja kasutamine

Patendiametile
with the Estonian Patent Office on


17.09.2002

Rahvusvahelise patendiklassifikatsiooni indeks
International Class

A61K 39/44

Tallinn,

22. 09. 2003

Elle Mardo 
Patendiosakonna juhataja
Head of Patent Department

Terapeutiliste rakkusisenevate antikehade saamine ja kasutamine

TEHNIKAVALDKOND

- 5 Leiutis käsitleb terapeutiliste rakkusisenevate antikehade kasutamist. Nimetatud terapeutilised antikehad leiaksid kasutamist vähiravis.

TEHNIKA TASE

- 10 Kõik fundamentaalsed bioloogilised protsessid, kaasa arvatud areng, immuunsus ja kasvajate teke, on seotud geenide valikulise ja erineva ekspresseerumisega erinevates kudedes ja rakutüüpides. Paljude pahaloomuliste kasvajate puhul on näidatud, et nende tekkimise põhjusteks on muutused signaalides, mis juhivad geenide valikulist ekspresseerumist. Kaasaegse molekulaarmeditsiini üheks eesmärgiks on leida viise
- 15 reguleerimaks geenide ekspressiooni elusorganismis ja sedakaudu uute ravistrateegiate väljatöötamine.

Vähkkasvajad on sageduselt teiseks surmapõhjuseks arenenud maailmas, seetõttu on ka arusaadav huvi nende tekke molekulaarsete mehhanismide ja efektiivse ravi vastu.

- 20 Komplekssete ravimeetoditega (kirurgilise-, kiiritus- ja tsütostaatilise ravi kombineerimisega) on haigete elulemust suudetud märgatavalt tõsta ja elukvaliteeti parandada, kuid otsustavat läbimurret ei ole õnnestunud siiski saavutada. Seetõttu on eriti viimasel kümnendil hakatud aktiivselt uurima põhimõtteliselt uute ravimeetodite (bioloogiline ravi, geeniteraapia) kasutamise võimalusi.

25

LEIUTISE OLEMUS

- Suurimaks probleemiks immunoteeraapia puhul on haigusspetsiifiliste rakupinnamarkerite vähesus. On leitud rida rakusiseseid haigustega seotud molekule, kahjuks on need aga
- 30 antikehadele kättesaamatud. Meie tehnoloogia lubab neid molekule kasutada ja seega tunduvalt laiendada antikehadele kättesaadavate spetsiifiliste markerite arvu. Meie poolt kasutatavad modifitseeritud antikehad pole toksilised, samuti pole toksilised ka selliste antikehade saamiseks kasutatud komponendid.

Käesoleva leiutise eesmärgiks on uute (vähi)spetsiifiliste rakkusisenevate antikehade tehnoloogia väljatöötamine. Nimetatud terapeutilised antikehad leiaksid kasutamist vähiravis, kusjuures nad toimiksid otseselt vähki tekitavate signaalide moduleerimise teel. Selliste antikehade oodatud efektiks ja toimepõhimõtteks on intratsellulaarsete valkude inaktiveerimine ja seega need oleksid kasutatavad haiguste puhul, kus efektiivseks raviks tuleb moduleerida rakusiseste valkude aktiivsust (eelkõige pahaloomulised kasvajakud ja haigused, mis on ravitavad erinevate rakusiseste immunogeensete ravimärklaudade (valkude, glükoproteiinide, jt) inaktiveerimise teel). Eespool nimetatud antikehade tehnoloogia leiaks rakendust ka mujal (nt teaduslaborites, kus tegeldakse rakusiseste valkude uurimisega jne).

Tehnoloogiate lühiülevaade

Antikehad

Antikehad on looduslikult esinevad valgud, mida immuunsüsteem toodab vastuseks väljast tulnud ainetele (antigeenidele), see on osa immuunvastusest. Antikehi on võimalik toota vastavalt vajadusele, kasutades antigeenidena meid huvitavaid molekule. Biomeditsiinis pakuvad huvi sellised antikehad, mis spetsiifiliselt tunnevad ära nt rakupinna elemente, teised (retseptor)valgud, mittevalgulised komponendid. Kuivõrd erinevate rakutüüpide pinnamarkerid on erinevad, on võimalik tekitada antikehad, mis tunnevad ära vaid üht kindlat rakutüüpi. Seda omadust on võimalik kasutada mitmete haigusvormide ravis: põletikulised haigused, autoimmuunhaigused (allergilised vastused), kudede transplanteerimisega seotud haigused, kardiovaskulaarsed haigused, nakkushaigused ja eelkõige mitmesugused kasvajakud, kuid seda loetelu ei tuleks võtta ammendavana. Antikehade teraapia tavapärases mõistes seisnebki neid haigusi põhjustavate molekule või rakutüüpe äratundvate antikehade kasutamises.

Antikehade tootmise tehnoloogia on standardne ja väga hästi kirjeldatud, kusjuures eksisteerib kaks erinevat strateegiat; monokloonsete ja polükloonsete antikehade tehnoloogia. Mõlemat tüüpi antikehasid kasutatakse laialdaselt mitmesuguses uurimis- ja arendustöös. Siiski ei oma sellised standardsed antikehad märkimisväärset potentsiaali terapeutiliste vahenditena, kuivõrd nende molekulmassist tulenevalt ei suuda nad rakkudesse siseneda, samuti nende difusioonikiirus kudedesse pole piisav efektiivseks

raviks. Samuti on standardised antikehad suhteliselt ebastabiilsed. Samuti täheldatakse mittespetsiifilisi kõrvaltoimeid.

- 5 Oleme välja töötanud strateegia nende probleemide lahendamiseks, käesolevas patenditaotluses tõestatakse nende strateegiate rakendamise võimalusi ravis ja muudes võimalikes rakendustes.

Rakkusisenevad peptiidid

- 10 Peptiidsete vektormolekulide (*cell-penetrating peptides*, CPPs) kasutamine bioloogiliselt aktiivsete molekulide transpordis pakub mitmeid eeliseid. See on efektiivne kõigis seni testitud eukariotsetes rakkudes, mis lubab neid kasutada *en masse*. Viimased tulemused lubavad neid kasutada ka kui hematootsefaalbarjääri läbivaid vektoreid [Schwarze, 1999 #14].

- 15 Transportaan on peptiid, milles on kombineeritud neuropeptiid galaniini ja herilasmürgi koostises oleva toksilise amfiifilise peptiidi mastoparaani fragmendid. Transportaan läbib rakumembraane, kusjuures see mehhanism pole ensümaatiline. Transportaan lokaliseerub rakutuuma, kus jaguneb tuumakeste vahel. Transportaaniga liidetud galaniini retseptori antisense PNA järjestus lokaliseeriti tuuma, mis kutsus esile vastava retseptori ekspressioonitaseme languse, nagu oleme näidanud nii *in vitro* kui *in vivo* eksperimentides
- 20 (Pooga *et al.*, 1998). Seega on transportaan sobilik transportpeptiid, millega rakku viia valke, kaasa arvatud antikehi. Transportaan ei kutsu esile märkimisväärseid tsütotoksilisi efekte. Praeguseks ajaks on kindlaks tehtud veel hulgaliselt teisi rakkusisenevaid peptiide, seega võimaldab antud leiutus ükskõik millise rakkusiseneva peptiidi kasutamist, mis on
- 25 kergesti mõistetav eriala asjatundjale. (Cell Penetrating Peptide; Advances and Applications, Editor Ü. Langel, SRS Press 22).

Nahavähk ja GLI valgud

- 30 Nahavähk (nii melanoomsed kui mittemelanoomsed vormid) on läänemaailmas kõige levinumaks vähitüübiks. Mittemelanoomne nahavähk on juba praegu naistel sageduselt teine vähitüüp, mille esinemine on viimase 10 aasta jooksul kahekordistunud. Mõlemate puhul on peamiseks riskiteguriks päikese UV kiirgus. Basaalrakuline kartsinoom (BRK) on läänemaailmas enamlevinud pahaloomuline kasvaja, mis sageli allub kirurgilisele ravile.

Seetõttu on selle kasvajatüübi efektiivse ravimi puhul olulisim eelkõige rahaline kokkuhoid kirurgiliste operatsioonide arvelt.

On selgunud, et suurt osa BRK juhtumeid, nii pärilikku kui sporaadilist vormi, põhjustavad mutatsioonid sekreteeritud faktori Sonic hedgehog faktori retseptorit kodeerivas geenis PTCH (*Drosophila Patchediga* homoloogne retseptor inimesel), mis viib hälveteni selle retseptori vahendatud signaaliülekanerajas (Dahmane *et al.*, 1997). Eespool kirjeldatud signaaliülekaneraja ülesandeks on kontrollida rakkude paiknemist embrüogeneesis. Selle signaaliülekaneraja efektoriks on nn GLI valgud, transkriptsioonifaktorid. GLI valk interakteerub tsütoplasmas tuumor-supressorgeeni SUFUH valguga (Kogerman *et al.*, 1999), mille tagajärjel inaktiveeritakse GLI valk.

Farmatseutiline segu

Käesoleva leiutise ulatuses on ka farmatseutiline segu, mis sisaldab leiutise molekule koos farmatseutiliselt sobivate kandeainete ja lisanditega. Nimetatud farmatseutilist segu võib saada standardsetel farmatseutilistel meetoditel, kasutades standardseid farmatseutilisi aineid.

Samuti kuulub käesoleva leiutise ulatusse meetod haiguse või terviserikke ravimiseks inimesel või loomal. Nimetatud meetod seisneb leiutise molekuli farmatseutiliselt sobiva doosi manustamises inimesele või loomale.

Eespool nimetatud farmatseutilist segu võib manustada peroraalselt, intravenoosselt või intraperitoneaalselt. Eelistatud manustamisviis on intravenoosne.

JOONISTE LOETELU

Joonisel fig 1 on toodud TP-10 HPLC kromatogramm (joonis fig 1A) ja MALDI-TOF spekter (joonis fig 1B).

Joonisel fig 2 on toodud hiire antiGLI IgG-TP10 konjugaat (joonis fig 2A), hiire FITC-konjugeeritud anti-IgG (joonis fig 2B), hiire anti-GLI1(IgG)-TP10 konjugaat (joonis fig 2C), hiire FITC-konjugeeritud anti-IgG (joonis fig 2D).

Joonisel fig 3A on kujutatud rakkusiseneva rekombinantse valgu tootmist ja puhastamist. Toodud on SDS-polüakrüülamiidgeeli pilt, mida on värvitud Coomassie briljantsinise värviga. Rada 1: molekulkaalu marker. Rada 2: indutseerimata *E. coli* rakulüsaat; rajad 3 ja 4: rakulüsaat, kus konstrukti ekspressiooni on indutseeritud IPTG-ga. Rajad 5-8 glutatioonagaroosilt elueeritud valgufraktsiooni 1-4.

Joonisel 3B on näidatud rekombinantse valgu rakkudesse sisenemist inimese 293 rakkudesse. Rakke inkubeeriti rekombinantsete valkudega ning nende sisenemist detekteeriti värvimisega fluoretsentsete anti-GST antikehadega. Alumisel joonisel on sama mikroskoopiavälja faaskontrasti kujutis.

TEOSTUSNÄITED

Oleme teostanud eeluuringud ja näidanud, et antikehad, mis on kombineeritud rakku sisenevate peptiididega, on võimelised efektiivselt läbima rakumembraane ja selliste peptiidide antikehadele liitmine ei vähenda viimaste võimet ära tunda spetsiifilisi antigeene.

Näide 1. Polükloonsete GLI1 antikehade saamine ja iseloomustamine

Polükloonsed GLI 1 valku äratundvad antikehad saadi küülikute immuniseerimise teel bakterites ekspresseeritud GLI1 1-407 antigeeniga kasutades standardmeetodeid. Saadud antikehi iseloomustati Westerni, EMSA ja immunohistokeemia meetodite abil.

Näide 2. Polükloonsete GLI3 antikehade saamine ja iseloomustamine

Polükloonsed GLI3 valku äratundvad antikehad saadi küülikute immuniseerimise teel bakterites ekspresseeritud GLI3 aa 150-250 antigeeniga kasutades standardmeetodeid. Saadud antikehi iseloomustati Westerni, EMSA ja immunohistokeemia meetodite abil.

Näide 3. Polükloonsete GLI1 antikehade konjugeerimine rakkusisenevate peptiididega

Rakkusisenevat peptiidi (TP10) sünteesiti etapiviisiliselt 0,1 mmol skaalas Applied Biosystem Model 430A peptiidisüntesaatoril, kasutades ditsükloheksüülkarbodiimiid /hüdrosübensotriasool-aktivatsioonistrateegiat. Peptiidi puhtus oli >99%, nagu näitas kontroll C₁₈ pöördfaas HPLC-kolonnil. Iga sünteetilise peptiidi molekulmass määrati

MALDI-TOF mass-spektromeetriga ja võrreldi saadud tulemust ennustatud molekulmassiga. Polükloonsed antikehad konjugeeriti rakkusisenevate peptiidide transportaani lühema analoogiga Transportan10 (TP10). Joonisel fig 1 on toodud CPPde konjugeerimine antikehadega, see teostati järgnevalt:

- 5 1) Viidi läbi CPP derivatisatsioon maleimidiks. Selleks lisati 200 ml peptiidilahusele fosfaatpuhvis (ph 7,5; 10 mg peptiidi/ml) SMCC lahus (suktsiinimidüül-*trans*-4-(maleimidüülmetüül)tsükloheksaan-1-karboksülaad, Mw 334; molaarne suhe 1/5). Kirjeldatud segu inkubeeriti 1-2 tundi toatemperatuuril. SMCC jäägid eraldati pöördfaasi C18 kolonnil HPLC-l.
- 10 2) Tioolrühmade deprotekteerimiseks antikehal lisati antikeha lahusele (fosfaatpuhver, pH 7,5) TCEP (tris-(2-karboksüetüül)fosfiin, Mw 287), molaarne suhe 1/5 ja inkubeeriti reaktsioonisegu 15 minuti jooksul.
- 3) Maleimiid-derivatiseeritud peptiidi konjugeerimine antikehaga. Selleks segati kokku eespool nimetatud maleimiid-derivatiseeritud peptiid ja antikeha lahus nii, et tekkis
- 15 ekvimolaarne segu ja inkubeeriti segu toatemperatuuril 3 tundi, selle aja jooksul tekkis antikeha ja peptiidi vahel tioester side. Kasutatud lahust kasutati edasistes katsetustes arvestusega, et konjugatsiooniefektiivsus oli 80%. Joonisel fig 1A TP-10 teoreetilisele molekulmassile vastas piik 7, nagu eksperimentaalselt näidati MALDI-TOF mass-spektromeetrilisel analüüsil.
- 20 Saadud konjugaat oli võimeline sisenema eukarüootsetesse koekultuuri rakkudesse (joonis fig 2). Joonisel fig 2A on toodud hiire antiGLI IgG-TP10 konjugaat, inkubeeritud 3 tundi Cos-1 rakkudel; anti-GLI1 IgG visualiseeritud FITC konjugeeritud hiire anti-IgG antikehaga. Joonisel fig 2B on toodud hiire FITC-konjugeeritud anti-IgG, inkubeeritud 3 tundi Cos-1 rakkudel. Joonisel fig 2C on toodud hiire anti-GLI1(IgG)-TP10 konjugaat,
- 25 inkubeeritud 14 tundi Cos-1 rakkudel; anti-GLI1 IgG visualiseeritud FITC konjugeeritud hiire anti-IgG antikehaga. Joonisel fig 2D on toodud hiire FITC-konjugeeritud anti-IgG, inkubeeritud 14 tundi Cos-1 rakkudel. Nimetatud polükloonsed antikehad seondusid spetsiifiliselt GLI1 valguga.

30 Näide 4. GLI1 vastaste monokloonsete antikehade saamine ja iseloomustamine

Monokloonsed GLI 1 valku äratundvad antikehad saadi hiirte immuniseerimise teel bakterites ekspresseeritud GLI1 1-407 antigeeniga kasutades standardmeetodeid. Eraldati 40 hübriidoomi kloon. Immuniseeritud hiirte põrnad eraldati ja põrnarakke fuseeriti Sp 2.0

müeloomirakkudega kasutades standardmeetodeid (Antibodies). Saadud antikehi iseloomustati Westerni, EMSA ja immunohistokeemia meetodite abil.

Näide 5. GLI3 vastaste monokloonsete antikehade saamine ja iseloomustamine

- 5 Monokloonsed GLI3 valku äratundvad antikehad saadi küülikute immuniseerimise teel bakterites ekspresseeritud GLI3 aa 150-250 antigeeniga kasutades standardmeetodeid (Antibodies). Saadud antikehi iseloomustati Westerni, EMSA ja immunohistokeemia meetodite abil.

10 Näide 6. Rakkusisenevate rekombinantsete valkude saamise tehnoloogia väljatöötamine.

Valisime rakkusiseneva rekombinantse valgu saamiseks liitvalgu, mis kodeeris GST valku ning lisaks GLI3 aa 150-250. Viisime nimetatud järjestusse PCR meetodil kahe erineva rakkusiseneva peptiidi kodeerivad järjestused. Valisime selleks TP10 ning 9Arg (9Arginiin) järjestused. Saadud ekspressioonikonstruktide õigsust kontrolliti DNA sekveneerimise meetodil. Ekspressioonikatsed näitasid, et hoolimata korduvatest üritustest, ei õnnestunud *E. colis* ekspresseerida rekombinantset valku, mis kodeeris TP10 järjestust. Seevastu õnnestus ekspresseerida ja puhastada rekombinantset valku, mis kodeeris rekombinantset 9Arg rakkusisenevat peptiidi (joonis fig 3A).

- 20 Nagu näidatud joonisel fig 3B, saadud rekombinantne valk sisenes imetajarakkudesse koekultuuris.

Näide 7. GLI vastaste rakkusisenevate rekombinantsete antikehade saamine ja iseloomustamine

- 25 Rekombinantsed antikehad saadi eespool nimetatud antikehade kloonide molekulaarbioloogilise menetluse käigus, kus antikeha kodeerivasse geeni viidi sisse rakkusiseneva peptiidi 9Arg kodeeriv järjestus. Saadud rekombinantsed antikehad puhastati afiinsuskromatograafiliselt ja määrati antikehade tiiter. Näidati, et need antikehad seondusid spetsiifiliselt GLI1 valguga. Need rekombinantsed antikehad sisenesid samuti
30 eukarüootsetesse koekultuuri rakkudesse.

Patendinõudlus

1. Molekuli, mis koosneb minimaalselt antikeha antigeeni äratundvast järjestusest ning rakkusisenevast transportpeptiidist, kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse või
5 tervisehäire ravimiseks.
2. Kasutamine vastavalt punktile 1, mis erineb selle poolest, et molekuliks on monokloonne antikeha, millele on keemiliselt konjugeeritud rakkusisenev transportpeptiid.
- 10 3. Kasutamine vastavalt punktile 1, mis erineb selle poolest, et molekuliks on polükloonsed antikehad, millele on keemiliselt konjugeeritud rakkusisenev transportpeptiid.
- 15 4. Kasutamine vastavalt punktitele 2 ja 3, mis erineb selle poolest, et monokloonsed või polükloonsed antikehad on saadud GLI1 valgu vastu.
5. Kasutamine vastavalt punktidele 2 ja 3, mis erineb selle poolest, et monokloonsed või polükloonsed antikehad on saadud GLI3 valgu vastu.
- 20 6. Kasutamine vastavalt punktile 1, mis erineb selle poolest, et molekul koosneb geneetiliselt modifitseeritud antikeha muutuvjärjestusest, millele on keemiliselt konjugeeritud või mille järjestusse on muul viisil viidud rakku sisenemiseks vajalik transportpeptiid.
- 25 7. Kasutamine vastavalt punktile 6, mis erineb selle poolest, et geneetiliselt modifitseeritud antikeha muutuvjärjestus on pärit inimese genoomist.
8. Kasutamine vastavalt punktile 7, mis erineb selle poolest, et inimese geneetiliselt modifitseeritud antikeha muutuvjärjestus on inimese immunsüsteemi omava transgeense
30 looma immuniseerimisel antigeeniga.

9. Kasutamine vastavalt punktidele 7, mis **erineb** selle poolest, et geneetiliselt modifitseeritud antikeha muutuvjärjestus on saadud inimese antikeha ekspressioonipanga skriinimisel antigeeniga.

5 10. Kasutamine vastavalt punktidele 7 kuni 9, mis **erineb** selle poolest, et antigeeniks on kasutatud GLI1 järjestusi.

11. Kasutamine vastavalt punktidele 7 kuni 9, mis **erineb** selle poolest, et inimese antikeha ekspressioonipanga skriinimisel on antigeeniks kasutatud GLI3 järjestusi.

10

12. Kasutamine vastavalt punktidele 1 kuni 11, mis **erineb** selle poolest, et rakkusisenevaks peptiidjärjestuseks on TP10.

15 13. Kasutamine vastavalt punktidele 1 kuni 11, mis **erineb** selle poolest, et rakkusisenevaks peptiidjärjestuseks on 9Arginiinist koosnev peptiid.

14. Kasutamine vastavalt punktidele 1 kuni 13, mis **erineb** selle poolest, et antigeenina kasutatakse ükskõik millist rakusisest ravimimärklauda.

20 15. Farmatseutiline segu, mis **sisaldab** vähemalt ühte punktidele 1 kuni 14 vastavat molekuli koos vähemalt ühe farmatseutiliselt sobiva kandeaine või lisandiga.

25 16. Meetod rekombinantse rakkusiseneva polüpeptiidi saamiseks, mis **hõlmab** antud polüpeptiidi kodeerivasse järjestusse rakkusiseneva peptiidi järjestuse viimist, rekombinantse valgu ekspresseerimist sobivas peremeesorganismis ning saadud valgu puhastamist.

Lühikokkuvõte

- Leiutis käsitleb uute (vähi)spetsiifiliste rakkusisenevate antikehade tehnoloogia väljatöötamist ning nende kasutamist inimese haiguste (eeskätt vähktõve) ravis. Selline
- 5 antikeha (ravim) toimiks otseselt vähki tekitavate signaalide moduleerimise teel. Selliste antikehade oodatud efektiks ja toimepõhimõtteks on intratsellulaarsete valkude inaktiveerimine ja seega need oleksid kasutatavad haiguste puhul, kus efektiivseks raviks tuleb moduleerida rakkusiseste valkude aktiivsust (eelkõige pahaloomulised kasvajakud, kuid ka paljud muud haigused, mis on ravitavad rakkusiseste valkude inaktiveerimise teel).
- 10 Eespool nimetatud antikehade tehnoloogia leiaks rakendust ka mujal (nt teaduslaborites, kus tegeldakse rakkusiseste valkude uurimisega jne).

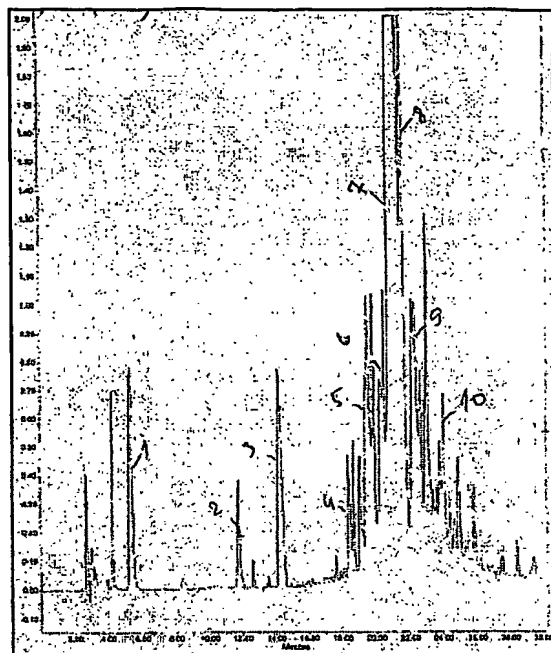


FIG 1A

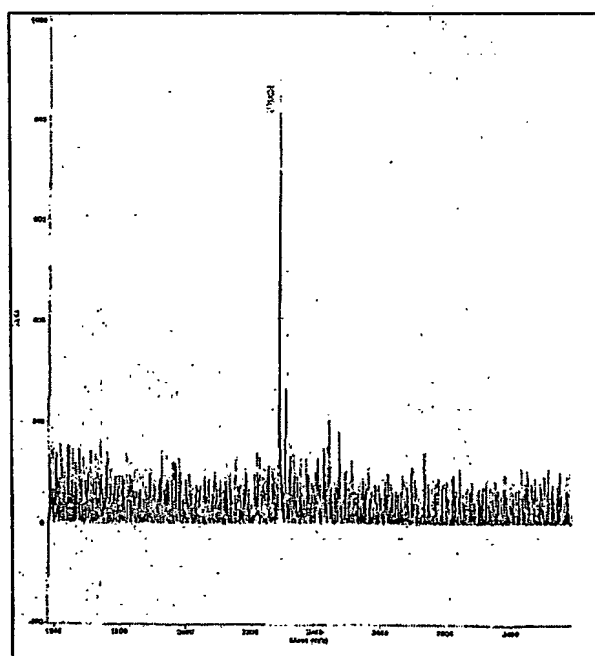


FIG 1B

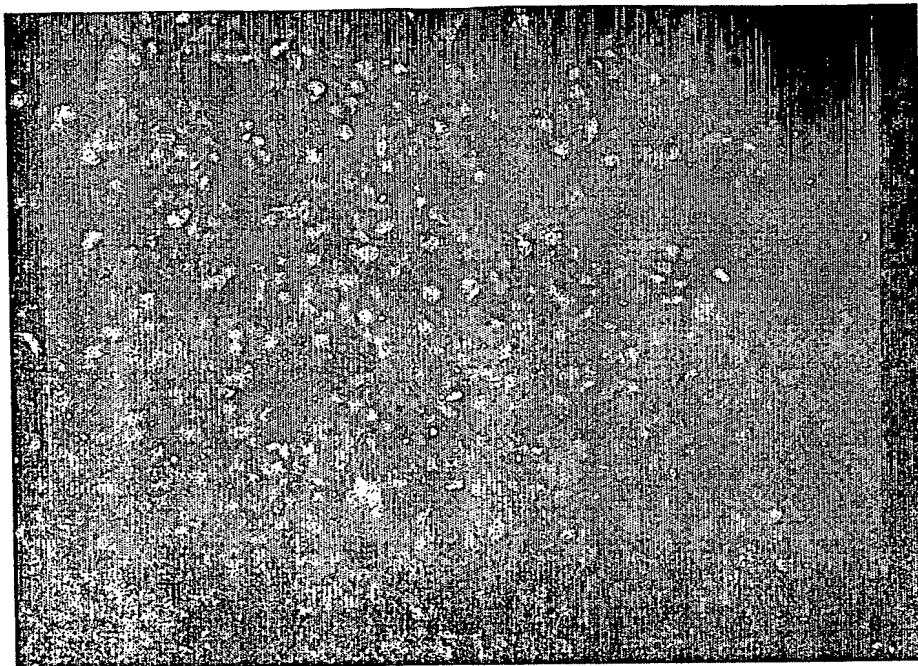


FIG 2A

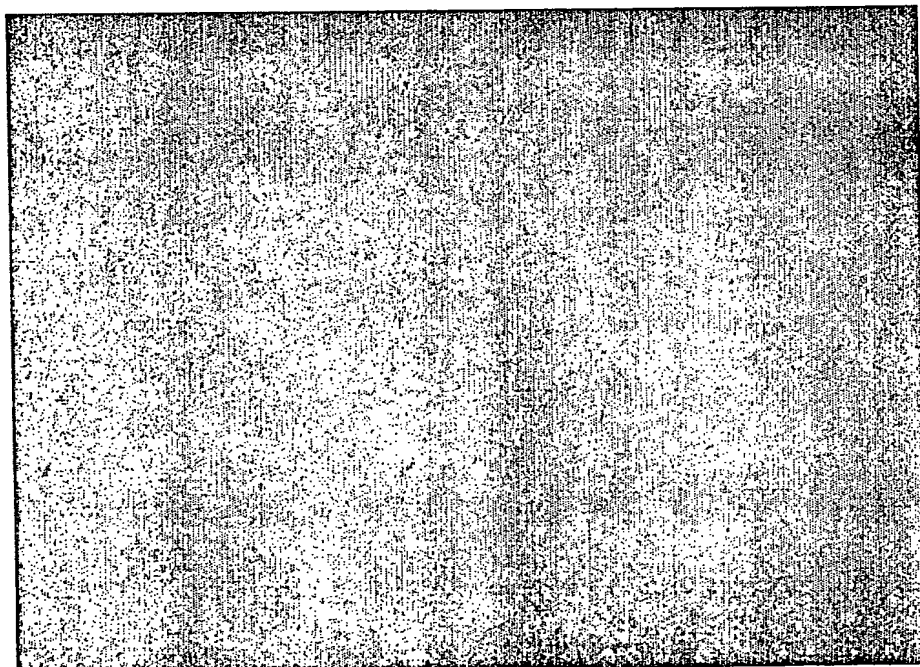


FIG 2B

BEST AVAILABLE COPY

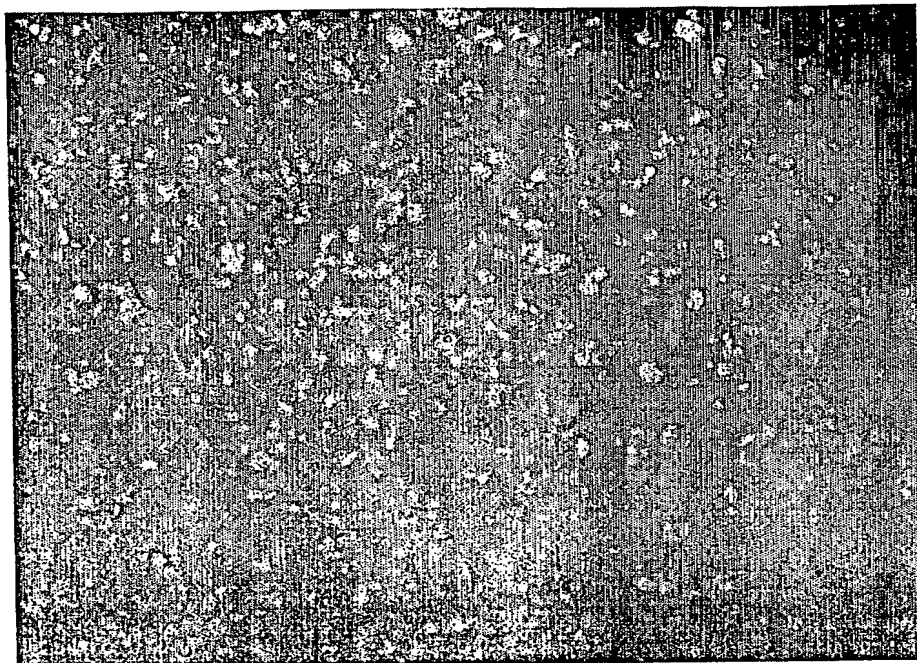


FIG 2C

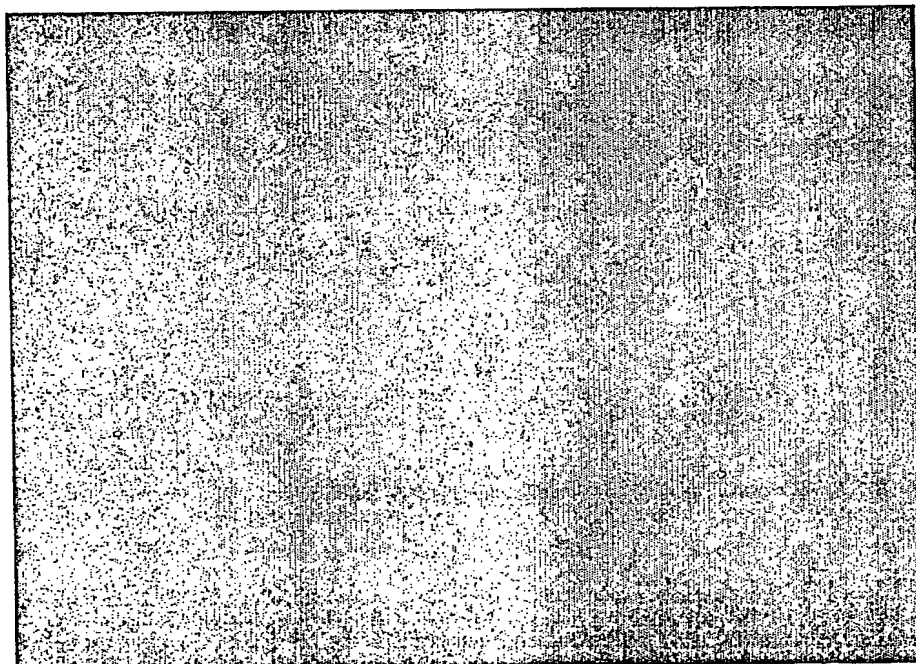


FIG 2D

BEST AVAILABLE COPY

1 2 3 4 5 6 7 8

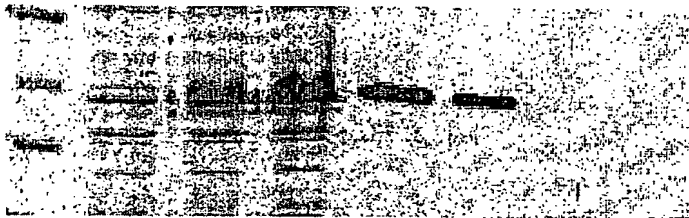
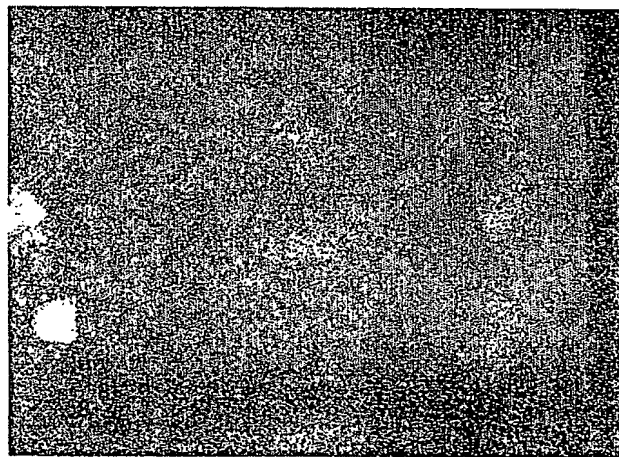


FIG 3A

Fluorescents



Faaskontrast

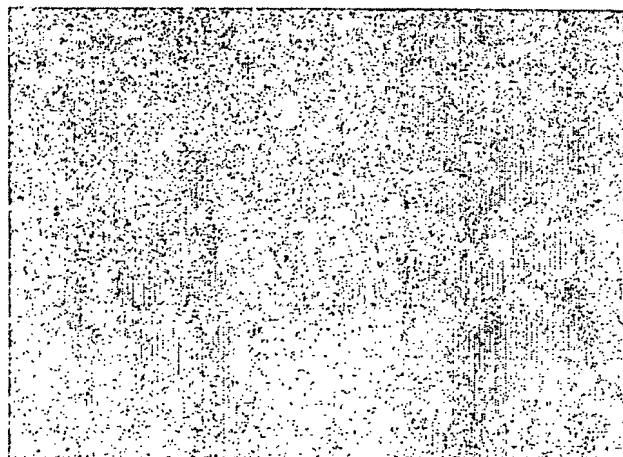


FIG 3B

BEST AVAILABLE COPY